

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

This Page Blank (uspto)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 257 542
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 87112023.4

(51) Int. Cl. 1: C12N 15/00 , C12N 9/10 ,
C12P 41/00

(22) Anmelddatum: 19.08.87

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaaten:
AT + ES.

Der (Die) Mikroorganismus (Mikroorganismen) ist
(sind) bei DSM unter der (den) Nummer(n) 40736
+ 4112 hinterlegt worden.

(30) Priorität: 23.08.86 DE 3628747
03.11.86 DE 3637307
16.12.86 DE 3642829
08.01.87 DE 3700313

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.03.88 Patentblatt 88/09

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: Strauch, Eckhard
Rosenheide 2
D-4800 Bielefeld(DE)
Erfinder: Wohlleben, Wolfgang, Dr.
Menzelstrasse 1
D-4800 Bielefeld(DE)
Erfinder: Arnold, Walter
Am Gottesberg 25
D-4800 Bielefeld(DE)
Erfinder: Alljah, Renate
Kösterkamp 14
D-4800 Bielefeld(DE)
Erfinder: Pühler, Alfred, Prof. Dr.
Am Waldschlösschen 2
D-4800 Bielefeld(DE)
Erfinder: Wöhner, Gerhard, Dr.
Flörshimer Strasse 27
D-6093 Flörsheim am Main(DE)
Erfinder: Marquardt, Rüdiger, Dr.
Günthersburgallee 69
D-6000 Frankfurt am Main(DE)
Erfinder: Grabley, Susanne, Dr.
Hölderlinstrasse 7
D-6240 Königstein/Taunus(DE)
Erfinder: Brauer, Dieter, Dr.
Berliner Strasse 14
D-6093 Flörsheim am Main(DE)
Erfinder: Bartsch, Klaus, Dr.
Memelstrasse 2
D-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)

A2

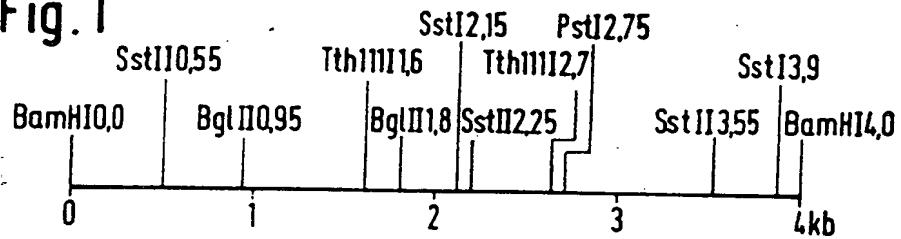
(54) Resistenzgen gegen Phosphinothricin und seine Verwendung.

(57) Durch Selektion von Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 gegen Phosphinothricyl-alanyl-alanin (PTC) erhält man PTC-resistente Selektanten. Aus der Gesamt-DNA dieser Selektanten erhält man durch Schneiden mit Bam HI, Klonieren eines 4,0 kb großen Fragments und Selektion auf PTC-Resistenz das DNA-Fragment, welches das Phosphinothricin (PTC)-Resistenzgen trägt. Dieses ist zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzen, aber auch als Resistenz-Marker sowie zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC geeignet.

EP 0 257

0 257 542

Fig. 1



Resistenzgen gegen Phosphinothricin und seine Verwendung

Phosphinothricin (PTC, 2-Amino-4-methylphosphinobuttersäure) ist ein Glutaminsynthetase-Inhibitor. PTC ist ein "Baustein" des Antibiotikums Phosphinothricyl-alanyl-alanin. Dieses Tripeptid (PTT) ist aktiv gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien und auch gegen den Pilz Botrytis cinerea (Bayer et al., Helv. Chim. Acta 55 (1972) 224). PTT wird von dem Stamm Streptomyces viridochromogenes TÜ 494 (DSM 40736, DSM 4112) produziert.

Aus der Deutschen Patentschrift 2 717 440 ist es bekannt, daß PTC als Totalherbizid wirkt. In der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 86/02097 sind Pflanzen beschrieben, deren Resistenz gegen PTC darauf zurückzuführen ist, daß sie Glutaminsynthetase überproduzieren. Solche Überproduktionen, beispielsweise infolge einer Genamplifikation, bergen jedoch die Gefahr der Instabilität in sich. Im Falle einer solchen Instabilität ginge also die Überproduktion an Glutaminsynthetase zurück und die kompetitive Inhibitorwirkung des PTC käme wieder zum Zuge.

Die Erfindung, die in den Patentansprüchen definiert ist, bezieht sich demgegenüber auf ein Resistenzgen gegen PTC und seine Verwendung zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzen. Darüber hinaus kann dieses Gen auch als Resistenz-Marker Verwendung finden. Weiterhin eignet sich das Gen zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC.

Das erfindungsgemäße Resistenzgen gegen PTC ist erhältlich aus der Gesamt-DNA von auf PTT-Resistenz selektiertem Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 durch Schneiden mit BamHI, Klonieren eines 4,0 kb großen Fragments und Selektion auf PTT-Resistenz. Die Restriktionskarte (Figur 1) charakterisiert dieses 4,0 kb-Fragment näher.

Durch Klonieren von Teilbereichen dieses 4 kb-Fragments wurde die Lage des Codierbereichs näher eingegrenzt. Hierbei zeigte sich, daß das Resistenzgen auf dem 1,6 kb SstII-SstI-Fragment (Positionen 0,55 bis 2,15 in Fig. 1) liegt. Durch Verdauung mit BglII wird das 0,8 kb große Fragment gewonnen, das nach Einbau in ein Plasmid und Transformation von S. lividans PTT-Resistenz vermittelt. Diese Resistenz ist durch die N-Acetylierung von PCT bedingt.

Die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert des 0,8 kb-Fragments ergibt die DNA-Sequenz I (Anhang). Aus den offenen Leserahmen dieser Sequenz läßt sich die Lage des Resistenzgens ermitteln (ab Position 258). Das Ende des Gens liegt beim vorletzten der wiedergegebenen Nucleotide (Position 806), d. h. das letzte Nucleotid (Position 807), ist der Beginn des Stop-Codons.

In der DNA-Sequenz I ist die "Shine-Dalgarno-Sequenz" durch Unterstrichen hervorgehoben, ebenso das als Startcodon wirkende GTG. Der maßgebliche Leseraum ist also in der obersten Zeile ausgedruckt.

Die DNA-Sequenz II zeigt die Restriktionsschnittstellen innerhalb des sequenzierten Gens. Enzyme, die die Sequenz mehr als sechsmal schneiden, sind nicht angegeben.

Das Antibiotikum PTT wird von Bakterien aufgenommen und zu PTC abgebaut. Dieses inhibiert bei Bakterien ebenfalls die Glutaminsynthetase, so daß die Bakterien an Glutaminmangel sterben. PTT-produzierende Bakterien sollten daher einen Mechanismus besitzen, der sie vor der Wirkung des PTT schützt, also entweder die Wiederaufnahme des produzierten PTT verhindert oder eine Modifikation des Abbauproduktes PTC ermöglicht. Überraschenderweise ist der PTT-Produzent S. viridochromogenes DSM 4112 aber gegen sein eigenes Antibiotikum sensitiv. Unerwarteterweise gelang es aber, durch Selektion auf PTT-Resistenz mit der überraschend hohen Rate von etwa 10^{-5} Selektanten zu finden, die gegen PTT resistent sind und auch das Untergrundwachstum der benachbarten Kolonien unterdrücken.

Aus der DNA dieser Selektanten wurde eine Genbank angelegt, indem die DNA isoliert, mit BamHI gespalten und in einen Streptomycetenvektor ligiert wurde. Das Ligationsgemisch wurde in den handelsüblichen Stamm S. lividans TK 23 transformiert, wobei je 1 µg Ligationsgemisch etwa 5000 bis 10000 Transformanten mit einem Insert von etwa 1 bis 5 kb erhalten wurden. Unter den Transformanten finden sich PTT-resistente S. lividans-Stämme. Durch Isolierung des Plasmids und Retransformation in S. lividans konnte gezeigt werden, daß die Resistenz plasmidcodiert ist. Das für die Resistenz verantwortliche Gen liegt auf einem 4 kb-BamHI-Fragment (Figur 1). Der Codierbereich ist auf dem 0,8 kb BglII-Fragment lokalisiert. Das BamHI-Fragment enthält keine Schnittstellen für die Enzyme ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, HpaI, KpnI, PvuI, PvuII und XbaI.

Der Vergleich mit der Restriktionskarte eines nicht näher charakterisierten Resistenzgens aus S. hygroscopicus FERM BP-130/ATCC 21705 (Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 0 173 327, Figur 7) zeigt, daß das erfindungsgemäße Resistenzgen von dem bekannten Gen verschieden ist, welches auf der Suche nach den PTT-Biosynthesegegenen gefunden wurde.

Durch Inkubation von Zellextrakten von S. viridochromogenes DSM 4112 und S. lividans TK 23 einerseits und der PTT-resistenten S. viridochromogenes-Selektante und einer plasmidtragenden S. lividans-Transformante andererseits mit PTC und Acetyl-Coenzym A konnte gezeigt werden, daß die letzten genannten Zellen eine acetylierende Aktivität zeigen. Chromatographische Befunde zeigen, daß die

5 Acetylierung an der Aminogruppe erfolgt.

Da auch in E. coli eine PTT-Resistenz festgestellt werden konnte und der Resistenzmechanismus somit auch in Gramnegativen Bakterien funktioniert, kann eine Resistenz auf Grund von Transportphänomenen ausgeschlossen werden. Das erfindungsgemäße Resistenzgen kann somit nach Kopplung an pflanzliche Promotoren mit geeigneten Vektoren in Pflanzen transformiert und es können so PTC-10 resistenten Pflanzen hergestellt werden.

Die N-Acetylierung von PTC kann auch zur Racemattrennung von synthetischem D,L-PTC genutzt werden, da selektiv nur die L-Form acetyliert wird.

Die Erfindung betrifft somit auch die Verwendung des Resistenzgens zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC.

15 Die von dem erfindungsgemäßen Resistenzgen kodierte PTCAcetyltransferase kann also dazu benutzt werden, racemisches PTC, wie es beispielsweise nach der deutschen Patentschrift 2 717 440 erhältlich ist, in die optischen Antipoden zu trennen, indem das Racemat der acetylierenden Wirkung dieses Enzyms ausgesetzt wird, wobei selektiv die L-Form angegriffen wird, während die D-Form unverändert bleibt. Das so erhaltene Gemisch kann dann aufgrund seiner unterschiedlichen Eigenschaften in an sich bekannter Weise aufgetrennt werden.

20 Es ist bekannt, N-Acyl-D,L-Aminosäuren mit gegebenenfallsträgerfixierten Acylasen in Kontakt zu bringen, wobei selektiv die L-Aminosäure freigesetzt wird, die aus dem Gemisch mit der N-Acyl-D-Aminosäure nach Ansäuern mit nicht wassermischbaren Lösemitteln extrahiert werden kann (Britische Patentschrift 1 369 462). Eine entsprechende Auf trennung von N-Acyl-D,L-PTC ist beispielsweise aus der 25 Deutschen Offenlegungsschrift 2 939 269 oder der US-Patentschrift 4 226 941 bekannt.

Das erfindungsgemäß zurückbleibende D-PTC kann in bekannter Weise racemisiert werden (Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer (EP-A) 0 137 371, Beispiel 8), und dann in den Prozeß zurückgeführt werden.

30 Die Isolierung des Enzyms, worunter hier und im folgenden auch immer der enzymatisch wirksame Teil verstanden werden soll, ist möglich, aber nicht erforderlich. Falls das Enzym isoliert wird, kann es in freier oderträgerfixierter Form eingesetzt werden. Geeignete Träger sind beispielsweise in der EP-A 0 141 223 beschrieben. Zweckmäßig wird jedoch das Enzym nicht isoliert, sondern man setzt beliebige PTC-resistente Zellen ein, die das erfindungsgemäße Enzym exprimieren. So kann zweckmäßig die PTT-resistente 35 Selektante von S. viridochromogenes DSM 4112 eingesetzt werden. Vorteilhaft kann auch eine beliebige, mit dem erfindungsgemäßen Gen transformierte Zelle zum Einsatz gelangen, die in der Lage ist, die PTCAcetyltransferase zu exprimieren. Das erfindungsgemäße Gen, worunter hier auch aktive Teile desselben verstanden werden, kann hierbei in plasmidintegrierter Form in die Wirtszelle eingebracht werden oder mit anderen üblichen gentechnischen Methoden, beispielsweise durch Transfektion. Zweckmäßig ist beispielsweise der Einbau in ein E. coli-Expressionsplasmid und Transformation von E. coli mit einem solchen 40 Plasmid, beispielsweise nach den aus EP-A 0 163 249 und 0 171 024 bekannten Verfahren.

Zur erfindungsgemäßen N-Acetylierung von L-PTC im Racemat können die Zellen, die die PTCAcetyltransferase exprimieren, in freier oder fixierter Form eingesetzt werden, wobei die üblichen Fixierungsmethoden Anwendung finden (z.B. Deutsche Offenlegungsschrift 3 237 341 und darin zitierte Literatur).

45 Die erfindungsgemäße enzymatische Acetylierung von L-PTC erfolgt in der für enzymatische Umsetzungen üblichen Weise, wobei sich die Verfahrensbedingungen an den Gegebenheiten des eingesetzten Organismus orientieren. Grundsätzlich kommen hierfür dieselben Methoden wie für die vorstehend genannten selektiven Entacylierungsverfahren in Betracht.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert. Teile und Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, sofern keine anderen Angaben gemacht werden.

Beispiel 1: PTT-resistente Selektanten

55 Der Stamm S. viridochromogenes DSM 4112 wurde auf Minimal-Medium (Hopwood et al., *Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich, England (1985), S. 233) angezogen und mit PTT in steigenden Konzentrationen versetzt. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml wurde pro etwa 10⁵ Kolonien eine resistente Kolonie gefunden.

Beispiel 2: Herstellung des Vektors

Das Plasmid pSVH1 (Europäische Patentschrift 0 070 522) wird mit BglII geschnitten, das etwa 7,1 kb große Fragment isoliert und mit dem 1,1 kb BclI-Fragment mit der Thiomreon-Resistenz (Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 0 158 201) ligiert. Man erhält das 8,15 kb große Plasmid pEB2 (Figur 2).

Beispiel 3: Isolierung des Resistenzgens

Aus den Selektanten gemäß Beispiel 1 isoliert man die Gesamt-DNA und spaltet sie mit BamHI. Das Plasmid pEB2 wird ebenfalls mit BamHI geöffnet, die beiden Ansätze vereinigt und ligiert. Das Ligationsgemisch wird nach S. lividans TK 23 (erhältlich bei der John Innes Foundation) transformiert, wobei je 1 µg Ligationsgemisch 5000 bis 10000 Transformanten mit einem Insert von etwa 1 - 5 kb erhalten werden. Selektion auf PTT-Resistenz ergibt 2 resistente S. lividans-Kolonien. Aus diesen wird das aufgezogene Plasmid isoliert und mit BamHI geschnitten. Man findet ein 4 kb BamHI-Fragment, welches das für die Resistenz verantwortliche Gen trägt. Dieses Plasmid erhielt die Bezeichnung pPR1 (Figur 3).

Durch Retransformation in S. lividans TK 23 kann gezeigt werden, daß die PTT-Resistenz plasmidcodiert ist, da die Transformanten auf Minimalmedium wachsen, das 100 µg/ml PTT enthält.

Beispiel 4: Nachweis der Inaktivierung von PTC durch N-Acetylierung

Zum Nachweis der acetylierenden Aktivität des klonierten Fragments wurden folgende Stämme untersucht: S. viridochromogenes DSM 40736, S. viridochromogenes (PTT-resistente Mutante), S. lividans TK23 und S. lividans TK 23 (pPR1).

Dazu werden die Stämme in Lysemedium A (Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 0 158 872, S. 6) angeimpft und 2 Tage bei 30°C im Rundschüttler inkubiert. Nach der Ernte wird 1 mg Mycel in einem geeigneten Puffer (z. B. RS-buffer: C. J. Thompson et al., J. Bacteriol. 151 (1982), 678-685) mit Ultraschall aufgeschlossen. Ein typisches Experiment zur Messung des PTC-Abbaus verläuft folgendermaßen:

250 µl Rohextrakt werden mit 100 µl PTC-Lösung (250 µg/ml) und 50 µl Acetyl-CoA (4 mg/ml) versetzt und 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die dann noch vorhandenen PTC-Mengen werden durch HPLC gemessen. Dabei ergibt sich folgendes Ergebnis:

	Stamm	<u>nicht umgesetztes PTC</u>	<u>eingesetztes PTC</u>
45	<u>S. lividans</u> TK23	100%	
50	<u>S. viridochromogenes</u> (DSM 40736)	72%	
55	<u>S. viridochromogenes</u> Selektante	7%	
	<u>S. lividans</u> TK23 (pPR1)	31%	

0 257 542

Daß es sich um eine N-Acetylierung des PTC handelt, kann durch Vergleich mit Referenzsubstanzen in der Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden (keine Anfärbung durch Ninhydrin).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

DNA-Sequenz I

IleTrpSerAspValLeuGlyAlaGlyProValLeuProGlyAspAspPhePheSerLeuGlyGlyThrSerIle
 AspLeuGluArgArgProGlyGlyArgSerGlyAlaAlaArgGlyArgLeuLeuProArgArgHisLeuHis
 ArgSerGlyAlaThrSerTrpGlyProValArgCysCysProGlyThrThrSerSerProSerAlaAlaProPro
 AGATCTGGAGCGACGTCTGGGGGCCGGTCCGGTCTGCCCGGGGGACGACTTCTTCCTCGCGGGCACCTCCA 75
 TCTAGACCTCGCTGCAGGACCCCCGGCCAGGCCACGACGGGCCCTGCTGAAGAAGAAGGGAGCCGCGTGGAGGT
 SerArgSerArgArgGlyProProArgAspProAlaAlaArgProArgSerArgArgGlyArgArgCysArgTrp
 AspProAlaValAspGlnProGlyThrArgHisGlnGlyProValValGluGluGlyGluAlaAlaGlyGlyAsp
 IleGlnLeuSerThrArgProAlaProGlyThrSerGlyProSerSerLysGluArgProProValGluMet

SerAlaLeuArgValValSerArgIleArgLysGluLeuGlyValProLeuArgLeuAlaValIlePheGluThr
 LeuGlyValAlaGlyGlyLeuAlaHisProGlnGlyThrArgArgAlaThrProAlaArgArgAspLeuArgAsp
 SerArgArgCysGlyTrpSerArgAlaSerAlaArgAsnSerAlaCysHisSerGlySerProOP SerSerArg
 TCTCGGGCGTTGCGGGTGGTCTCGCGCATCCGCAAGGAACCTGGCGT6CCACTCCGGCTCGCCGTGATCTTGAGA 150
 AGA6CCGCAACGCCACCAGAGCAGCTAGGGCGTTCTGAGCCGACGGTGAGGCCGAGCGGGCACTAGAAAGCTCT
 ArgProThrAlaProProArgAlaCysGlyCysProValArgArgAlaValGlyAlaArgArgSerArgArgSer
 ArgArgGlnProHisAspArgAlaAspAlaLeuPheGluAlaHisTrpGluProGluGlyHisAspGluLeuArg
 GluAlaAsnArgThrThrGluArgMetArgLeuSerSerProThrGlySerArgSerAlaThrIleLysSerVal

ProSerLeuGluAlaValAlaGluSerValLeuArgGluLeuLysGlyThrAM OC ArgGlyAlaArgHisPro
 AlaValProGlySerGlyGlyArgIleArgThrProArgThrGluGlyAspValValLysArgCysProProPro
 ArgArgProTrpLysArgTrpProAsnProTyrSerAlaAsnOP ArgGlyArgSerLysGluValProAlaThr
 CGCCGTCCTGGAAAGCGGGTGGCCGAATCCGTACTCCGCGAACCTGAAGGGGACGTAGTAAAGAGGTGCCGCCACC 225
 GC6GCAGGGACCTTCGCCACCAGCTTAGGCATGAGGCCTTGACTTCCCCTGCATCATTCTCCACGGCGGTGG
 AlaThrGlyProLeuProProArgIleArgValGlyArgValSerProSerThrThrPheLeuHisGlyGlyGly
 ArgGlyGlnPheArgHisGlyPheGlyTyrGluAlaPheGlnLeuProArgLeuLeuSerThrGlyAlaValArg
 GlyAspArgSerAlaThrAlaSerAspThrSerArgSerPheProValTyrTyrLeuProAlaArgTrpGly

LeuSerGlnAsnThrGluGlyArgProHisValSerProGluArgArgProValGluIleArgProAlaThrAla
 AlaPheAlaGluHisArgArgLysThrThrArgGluProArgThrThrProGlyArgAspProSerArgHisArg
 ArgPheArgArgThrProLysGluAspHisThrOP AlaGlnAsnAspAlaArgSerArgSerValProProPro
 CGCTTCGCAGAACACCGAAGGAAGACCACACGCTGAGGCCAGAACGACGCCGGTCGAGATCCGTCCGCCACCG 300
 GCGAAAGCCTTGTGGCTTCCTCTGGTGTGCACTCGGGTCTTGCTGCGGGCCAGCTAGGGCAGGGCGGTGG
 AlaLysAlaSerCysArgLeuPheValValArgSerGlyLeuValValGlyProArgSerGlyAspArgTrpArg
 LysArgLeuValGlyPheSerSerTrpValHisAlaTrpPheSerAlaArgAspLeuAspThrGlyGlyGlyGly
 SerGluCysPheValSerProLeuGlyCysThrLeuGlySerArgArgGlyThrSerIleArgGlyAlaValAla

AlaAspMetAlaAlaValCysAspIleValAsnHisTyrIleGluThrSerThrValAsnPheArgThrGluPro
 ArgArgHisGlyGlyLeuArgHisArgGlnSerLeuHisArgAspGluHisGlyGlnLeuProTyrGlyAla
 ProProThrTrpArgArgSerAlaThrSerSerIleThrThrSerArgArgAlaArgSerThrSerValArgSer
 CCGCCGACATGGCGGCGGTCTCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCACGGTCAACTTCCGTACGGAGC 375
 66CGGCTGTACCGCCGCCAGACGCTGTAAGCTAGTTAGCTCTGCTCGT6CCAGTTGAAGGCATECCTCG
 ArgArgCysProProProArgArgCysArgOP AspSerCysArgSerSerCysProOP SerGlyTyrProAla
 GlyValHisArgArgAspAlaValAspAspIleValValAspLeuArgAlaArgAspValGluThrArgLeuArg
 AlaSerMetAlaAlaThrGlnSerMetThrLeuOP AM MetSerValLeuValThrLeuLysArgValSerGly

GlnThrProGlnGluTrpIleAspAspLeuGluArgLeuGlnAspArgTyrProTrpLeuValAlaGluValGlu
 AlaAspSerAlaGlyValAspArgArgProGlyAlaProProGlyProLeuProLeuAlaArgArgArgGlyGly
 ArgArgLeuArgArgSerGlySerThrThrTrpSerAlaSerArgThrAlaThrProGlySerSerProArgTrp
 CGCAGACTCCGCAGGGAGTGGATCGACGACCTGGAGCGCCCTCCAGGGACCGCTACCCCTGGCTCGTCCGGAGGTGG 450
 GCGTCTGAAGGCCTCCTCACCTAGCTGCTGGACCTCGCGGGAGGTCTGGC6ATGGGGACCGAGCG6CTCCACC
 AlaSerGluAlaProThrSerArgArgGlyProAlaGlyGlyProGlySerGlyArgAlaArgArgArgProPro
 LeuSerArgLeuLeuProAspValValGlnLeuAlaGluLeuValAlaValGlyProGluAspGlyLeuHisLeu
 CysValGlyCysSerHisIleSerSerArgSerArgTrpSerArgAM GlyGlnSerThrAlaSerThrSer

DNA-Sequenz I (Fortsetzung)

GlyValValAlaGlyIleAlaTyrAlaGlyProTrpLysAlaArgAsnAlaTyrAspTrpThrValGluSerThr
 GlyArgArgArgArgHisArgLeuArgArgProLeuGluGlyProGlnArgLeuArgLeuAspArgArgValAsp
 ArgAlaSerSerProAlaSerProThrProAlaProGlyArgProAlaThrProThrThrGlyProSerSerArg
 AGGGCGTCGTCGCCGCATCGCCTACGCCGGCCCTGGAAAGGCCGCAACGCTACGACTGGACCGTCGAGTCGA 525
 TCCCAGCAGCGGCCGTAGCGGATGCGGCCGGGACCTCCGGCGTTGCGGATGCTGACCTGGCAGCTCAGCT
 ProArgArgArgCysArgArgArgGlyArgSerProGlyCysArgArgSerSerArgArgThrSer
 AlaAspAspGlyAlaAspGlyValGlyAlaGlyProLeuGlyAlaValGlyValValProGlyAspLeuArgArg
 ProThrThrAlaProMetAlaAM AlaProGlyGlnPheAlaArgLeuAlaAM SerGlnValThrSerAspVal

 ValTyrValSerHisArgHisGlnArgLeuGlyLeuGlySerThrLeuTyrThrHisLeuLeuLysSerMetGlu
 GlyValArgLeuProProAlaProAlaAlaArgThrGlyLeuHisProLeuHisProProAlaGluValHisGly
 ArgCysThrSerProThrGlyThrSerGlySerAspTrpAlaProProSerThrProThrCysOP SerProTrp
 CGGTGTACGTCTCCCACCAGGCACCAGCGGCTCGGACTGGGCTCCACCCCTACACCCACCTGCTGAGTCCATGG 500
 GCCACATGAGA666GTGGCCGTGGTCGCCGAGCCTGACCCGAGGTGGGAGATGTGGGTGGACGACTTCAGGTACO
 ProThrArgArgGlyGlyAlaGlyAlaAlaArgValProSerTrpGlyArgCysGlyGlyAlaSerThrTrpPro
 HisValAspGlyValProValLeuProGluSerGlnAlaGlyGlyGluValGlyValGlyValGlnGlnLeuGlyHisLeu
 ThrTyrThrGluTrpArgCysTrpArgSerProSerProGluValArgAM ValTrpArgSerPheAspMetSer

 AlaGlnGlyPheLysSerValValAlaValIleGlyLeuProAsnAspProSerValArgLeuHisGluAlaLeu
 GlyProGlyLeuGlnGluArgGlyArgArgHisArgThrAlaGlnArgProGluArgAlaProAlaArgGlyAla
 ArgProArgAlaSerArgAlaTrpSerProSerSerAspCysProThrThrArgAlaCysAlaCysThrArgArg
 A6GCCCA666CTTCAAGAGCCTGGTGGCGTCATCGGACTGCCAACGACCCGAGCGTGGCCTGACGAGGC6C 675
 TCCGG6TCCCAGATTCTCGCACCAAGCGGAGTAGCCTGACGGGTTGCTGGCCTGACGCGGAGCTGCTCCGCG
 ProGlyProSerOP SerArgProArgArgOP ArgValAlaTrpArgGlySerArgAlaGlyAlaArgProAla
 -GlyLeuAlaGluLeuAlaHisAspGlyAspAspSerGlnGlyValValArgAlaHisAlaGlnValLeuArgGlu
 AlaTrpProLysLeuLeuThrThrAlaThrMetProSerGlyLeuSerGlyLeuThrArgArgCysSerAlaSer

 GlyTyrThrAlaArgGlyThrLeuArgAlaAlaGlyTyrLysHisGlyGlyTrpHisAspValGlyPheTrpGln
 ArgIleHisArgAlaArgAspAlaAlaGlySerArgLeuGlnAlaArgGlyLeuAlaArgArgGlyValLeuAla
 SerAspThrProArgAlaGlyArgCysGlyGlnProAlaThrSerThrGlyAlaGlyThrThrTrpGlySerGly
 TCGGATACACCAGCGC6G66AC6CTGCGGGCAGCCGGCTACAAGCAGG66GGCTGGCACGACGTGGGTTCTGGC 750
 AGCCTATGTGGCGCGCGCCCTGCGACGCCGTCGGCCGATGTTCTGCCCGGACCGTGCTGACCCCCAAGACCG
 ArgIleCysArgAlaArgSerAlaAlaProLeuArgSerCysAlaArgProSerAlaArgArgProThrArgAla
 SerValGlyArgAlaProArgGlnProCysGlyAlaValLeuValProAlaProValValHisProGluProLeu
 ProTyrValAlaArgProValSerArgAlaAlaProAM LeuCysProProGlnCysSerThrProAsnGlnCys

 ArgAspPheGluLeuProAlaProProArgProValArgProValThrGlnIle
 AlaArgLeuArgAlaAlaGlyProAlaProProArgProAlaArgHisThrAsp
 SerAlaThrSerSerCysArgProArgProAlaProSerGlyProSerHisArgSer
 AGCGCGACTTCGAGCTGCCGGCCCCGCCCCGCCCCGTCACACAGATCT 807
 TCGCGCTGAAAGCTCGACGGCCGGGGC6666C6666CAG6CCGGGGCAGTGTGCTAGA
 AlaArgSerArgAlaAlaProGlyAlaGlyArgGlyAlaArgOP ValSerArg
 AlaValGluLeuGlnArgGlyArgGlyAlaGlyAspProGlyAspCysLeuAsp
 ArgSerLysSerSerGlyAlaGlyGlyArgGlyThrArgGlyThrValCysIle

DNA-Sequenz II

5 1 AGATCTGGAGCGACGTCTGGGGCCGGTCCGGTGCCTGCCCCGGGACGACTTCTTCTCCC
 TCTA6ACCTC6CTGCA6GACCCCCGGCCAGGCCACGACGGGCCCCCTGCTGAAGAAGAGGG
 10 1 BGLII XHOII, 2 DPNI SAU3A, 5 GSUI, 12 AATII ACYI, 13 MAEII
 . 17 APYI ECORII, 26 RSRII, 27 AVAII, 35 BBVI, 39 AVAI NCII
 SMAI, 40 NCII, 52 MBOII, 59 MNLI.
 15 51 TCGGGGGCACCTCCATCTCGCGTTGCAGGTGGT66TCTCGC6CATCC6CAAGGAACCTGGC6
 AGCC6CCGTGGAGGTAGAGCCGAAAC6CCCACCA6GCGC6TA66CGTTCCCTGAGCCGC
 20 66 HGICI, 70 MNLI, 97 FNUDII, 100 SFANI, 101 FOKI.
 121 121 TGCCACTCCGGCTCGCC6T6ATCTTC6AGACGCCGTCCCT66AAGCG6T66CC6AATCC6
 ACG6TGAGGCCGAGCGGCACTAGAAGCTCT6C66CAG66ACCTTCGCCACC66CTTAGGC
 25 122 BGLI, 140 DPNI SAU3A, 142 MBOII, 149 ACYI HGAI TTH111I,
 158 APYI ECORII, 169 CFRI 6DIII, 174 HINFI, 180 RSAI.
 181 181 TACTCC6CGAACTGAAGGGGAC6TAGTAAAGAGGT6CCC6CCACCC6CTTC6CAGAACAA
 AT6A66C6CTT6ACTTCCCCCT6CATCATTTCTCCAC6GGC66T666C6AAAGC6TCTT6T
 25 186 FNUDII, 201 MAEII, 211 MNLI, 213 HGICI, 214 SDUI,
 241 241 CCGAAGGAAAGACACACGT6AGGCCAGAAC6ACGCC6GT6AGATCC6TCC6CCACCG6
 66CTTCCTTCT66T6T6CACTCG66TCTT6CT6C666CCAGCTCTAG66CA666C66T66C
 30 247 MBOII, 254 AFLIII, 255 PMACI, 256 MAEII, 260 HGIIII SDUI
 , 271 ACYI HGAI, 275 NCII, 283 XHOII, 284 BINI DPNI SAU3A.
 301 301 CG6CC6ACAT66C66C66TCT6C6ACATC6TAATCACTACATC6A6AC6A6CAC66TCA
 66C66GT6TACCGCCAGACGCT6TA6CAGTT6AT6TA6CTCT6CTCGT6CCAGT
 303 BGLI, 308 NLAIII, 324 TTH111I, 350 HGIAI SDUI, 357 HINCI
 I.
 40 361 ACTTCCGTACGGAGCC6CAGACTCC6CAGGGAGT66ATC6ACGACCT66AGC6CCTCC6A66
 T6AAGGGAT6CCTC66C6TCT6AG66C6TCCCTCACCTA6CT6CT66ACCTC6C66GAG6TCC
 45 367 RSAI, 380 HINFI, 394 BINI, 395 DPNI SAU3A, 404 APYI ECOR
 II, 405 GSUI, 409 HAEII, 413 MNLI, 414 GSUI, 416 APYI ECORII
 , 419 AVAII.
 421 421 ACCGCTACCCCT66CTC6TCGCC6A6GT66AGGGC6TC6TCGCC66CATCGCCTAC6CCG
 T66C6AT6666ACCGAGCAGC6GGCTCCACCTCC6CAGCAGC66CC6TA6C66AT6C66C
 50 430 APYI ECORII, 444 MNLI, 450 MNLI, 453 ACYI, 454 HGAI, 452
 NAEI, 466 SFANI, 477 NAEI.
 481 481 6CCCCT66AAGGCCCGCAAC6CCTAC6ACT66ACCGTCGAGTC6AC66T6TAC6TCTCCC
 CGGG6ACCTTCC66C6TT6C6GGAT6CT6ACCTGGCAGCTCAGCT6CCACAT6CAGA666
 55 484 APYI ECORII, 511 AVAII, 519 HINFI, 521 ACCI HINCII SALI,
 530 RSAI, 532 MAEII.

DNA-Sequenz II (Fortsetzung)

541 ACCGGCACCGGGCTCGGACTGGGCTCCACCCCTCTACACCCACCTGCTGAA6TCC,
TGGCCGTGGTCGCCAGCCTGACCCGAGGTGGGAGATGTGGGTGGACGACTTCAGGT,
544 HGICI, 549 NSPBII, 563 HGIJII SDUI, 572 MNLI, 578 TAQII,
583 BSPMI, 595 NCOI STYI, 596 NLAIII, 600 MNLI,
601 AGGCCAGGGCTTCAAAGAGCGTGGTCGCCGTATCGGACTGCCAACGACCCGAGCGTGC
TCCGGGTCCCAGGTTCTCGCACCAAGCGGCAGTAGCCTGACGGGTTGCTGGGCTCGCACG
605 APYI ECORII, 650 AVAI,
661 6CCTGACGA66CGCTCGGATACACCGCGCGGACGCTGCGGGCAGCCGGCTACAAGC
CGGACGTGCTCCGCGAGCCTATGTGGCGCGGCCCTGCGACGCCGCTGGCGATGTTCG
669 MNLI, 671 HAEII, 686 FNUDII, 687 BSSHII, 688 FNUDII, 690
FNUDII, 695 HGAI, 698 BBVI, 705 BBVI, 708 NAEI, 716 TTHIII
I,
721 AC66666CTGGCACGACGTGGGTTCTGGCAGCGCAGCTTCGAGCTGCCGGCCCCGCCCC
T6CCCCCGACCGTGGCACCCCAAGACCGCTCGCGCTGAA6CTCGACGGCCGGGGCGGGGG
732 DRAIII, 736 MAEII, 749 BBVI, 753 FNUDII, 763 ALUI, 764 B
BVI, 767 NAEI,
781 GCCCCGTCG66CCCGTACACAGATCT
CGGGGCAAGGCCGGGAGTGTGCTAGA
795 MAEIII, 802 BGLII XHOII, 803 DPNI SAU3A

Ansprüche

- 45 1. Resistenzgen gegen Phosphinothricin (PTC), erhältlich aus der Gesamt-DNA von auf Phosphinothricyl-alanyl-alanin (PTT)-Resistenz selektiertem Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 durch Schneiden mit BamH I, Klonieren eines 4,0 kb großen Fragments und Selektion auf PTT-Resistenz.

46 2. Gen nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Restriktionskarte gemäß Figur 1.

47 3. Gen nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch die DNA-Sequenz I (Anhang), Position 258-806.

48 4. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzen.

49 5. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 als PTT-Resistenz-Marker in Bakterien.

50 6. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 als PTC-Resistenzmarker in Pflanzenzellen.

51 7. Verwendung des Gens nach Anspruch 1 bis 3 zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC.

Patentansprüche für die folgenden Vertragsstaaten: Österreich und Spanien

- 55 1. Verfahren zur Gewinnung eines Resistenzgens gegen Phosphinothricin (PTC), dadurch gekennzeichnet, daß man aus der Gesamt-DNA von auf Phosphinothricyl-alanyl-alanin (PTT)-Resistenz selektiertem Streptomyces viridochromogenes DSM 4112 durch Schneiden mit BamH I ein 4.0 kb großes Fragment isoliert, dieses ganz oder ein das Resistenzgen enthaltendes Teilstück davon kloniert und auf PTT-Resistenz selektiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das innerhalb des 4,0 kb großen BarnHI-Fragments gelegene, 0,8 kb große BgIII-Fragment kloniert.
3. Verwendung des nach Anspruch 1 oder 2 erhältlichen Gens zur Herstellung PTC-resistenter Pflanzen.
4. Verwendung des nach Anspruch 1 oder 2 erhältlichen Gens als PTT-Resistenzmarker in Bakterien.
5. Verwendung des nach Anspruch 1 oder 2 erhältlichen Gens als PTC-Resistenzmarker in Pflanzenzellen.
6. Verwendung des nach Anspruch 1 oder 2 erhältlichen Gens zur selektiven N-Acetylierung der L-Form von racemischem PTC.

10

15

20

25

30

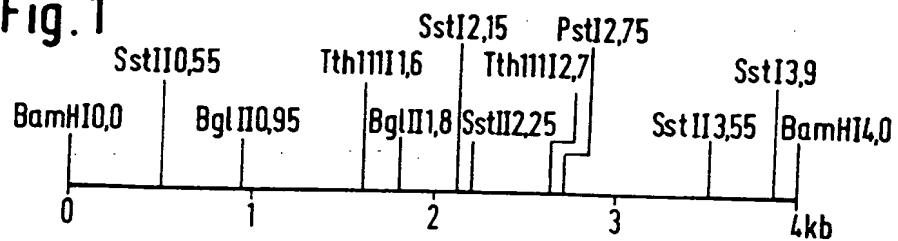
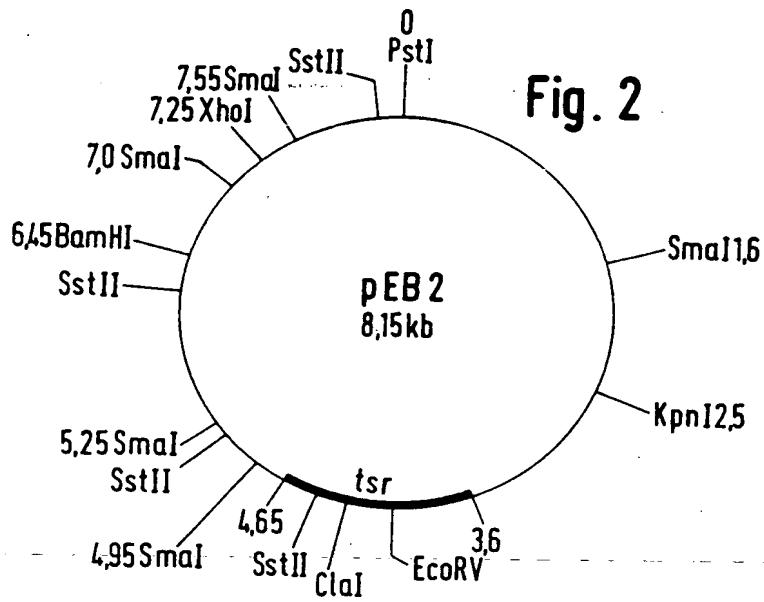
35

40

45

50

55

Fig. 1**Fig. 2****Fig. 3**